

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PURIFICAÇÃO DE UMA MIOTOXINA DA PEÇONHA DE *Bothrops
neuwiedi pauloensis* (Jararaca Pintada) E SUA AÇÃO SOBRE O
MÚSCULO GASTROCNEMIUS DE CAMUNDONGOS.**

RENATA SANTOS RODRIGUES

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG
Junho-2001**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PURIFICAÇÃO DE UMA MIOTOXINA DA PEÇONHA DE
Bothrops neuwiedi pauloensis (Jararaca Pintada) E SUA AÇÃO
SOBRE O MÚSCULO GASTROCNEMIUS DE
CAMUNDONGOS**

RENATA SANTOS RODRIGUES

Prof^a Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG
Junho-2001**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PURIFICAÇÃO DE UMA MIOTOXINA DA PEÇONHA DE
Bothrops neuwiedi pauloensis (Jararaca Pintada) E SUA AÇÃO
SOBRE O MÚSCULO GASTROCNEMIUS DE CAMUNDONGOS.**

RENATA SANTOS RODRIGUES

Aprovada pela Banca Examinadora em 25/06/2001

Nota: 100

Prof^ª Dr^ª Maria Inês Homsí Brandeburgo
Orientadora.

Prof^ª Dr^ª Amélia Hamaguchi
Co-Orientadora.

Prof^ª Dr^ª Ana Alice Diniz Santos
Co-Orientadora.


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^ª Dra. Ana Angelica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, ____ de ____ de ____.

Dedico este trabalho a
minha Mãe e avó,
Aparecida Basílio Santos
que mesmo não sabendo o
contexto deste trabalho,
sempre esteve interessada
em saber qual seria meu
futuro profissional. Que
daí de cima a senhora
esteja olhando por este
futuro que sonhava tanto.

Agradecimentos

À Deus pela grande força que sempre me dá nos momentos de tristeza e alegria, pelas vezes que pensei em desistir e de alguma maneira me mostrava que esta não seria a melhor forma.

Aos meus grandes pais Maria Emília e José Rodrigues, que me incentivaram muito nesta escolha profissional, a eles todo mérito deste trabalho.

Aos meus irmãos Júnior, Tarcília e Mário, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos. EU AMO VOCÊS.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Inês Homs Brandeburgo pela dedicação, convivência e paciência em ler e reler meu trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Amélia Hamaguchi pela grande disposição em querer ajudar e ensinar a todos, dando opiniões e conselhos importantes para realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Ana Alice Diniz Santos por ter sido a primeira professora a ter me acolhido na Universidade e por ter aceito o convite de me orientar neste trabalho, minha grande admiração e meu muito obrigado.

Aos meus grandes AMIGOS de laboratório Luiz Fernando e Poliana, por sempre estarem prontos a me ajudar nos momentos difíceis deste trabalho, pode ter certeza que este trabalho também é mérito de vocês.

Ao Fábio Oliveira que foi a pessoa com quem aprendi tudo no início, sendo paciente e amigo nas horas de dúvidas.

Aos amigos do laboratório que hoje são muitos, Willian, Rodrigo, Gilvan, Fran, Taty, Júnia, Cris, Ana Flávia, Elisângela, Fábio Moroni, Luiz Carlos, Carla;Helen;Veridiana, Tianinha, Cleuber, Nenzinha e Marlene.

Aos professores da histologia e em especial aos técnicos Rui Silva e Hégio que sempre estiveram prontos a me ajudar a todos os momentos deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular, em especial ao Pablo pela grande paciência em me ajudar a todos os momentos que precisei.

Às GRANDES AMIGAS que fiz no decorrer de quatro anos de curso Ariane, Juliana, Rosa Lya, Gabriela e às amigadas que se fizeram no passado e que hoje tenho apenas boas lembranças. AMO VOCÊS AMIGAS.

À 46^a Turma de Ciências Biológicas, pelos momentos de farra e festa, pelos colegas e amigos que passaram em minha vida.

Ao meu colega, amigo e hoje namorado Jean Carlos, “E no meio de tanta gente eu encontrei você, entre tanta gente chata sem nenhuma graça você veio e eu que pensava que não ia me apaixonar nunca mais na vida. TE AMO”.

A Fapemig pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

<u>1-Introdução</u>	1
<u>2-Objetivo</u>	6
<u>3-Material</u>	7
3.1 - Obtenção da peçonha de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> .	7
3.2 - Materiais para cromatografia, eletroforese, dosagem protéica, atividade enzimática, atividade coagulante	7
3.3 - Animais	8
<u>4-Métodos</u>	9
4.1 - Determinação da Quantidade de Proteínas	9
4.2 - Estudo da termoestabilidade da peçonha bruta de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> .	10
4.2.1 - Preparação das amostras para análise eletroforética.	10
4.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes.	10
4.3 - Ensaio Biológicos.	11
4.3.1 - Atividade Fosfolipásica.	11
4.3.2 - Atividade Hemorrágica.	12
4.3.3 - Atividade Coagulante.	12
4.4 - Fracionamento em SP-Sephadex C-25 das toxinas termoestáveis da peçonha bruta de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> .	12
4.4.1 - Preparação da Resina.	12

Abreviaturas

PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida.
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE-SDS - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TEMED - N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamino
Bis-Acrilamida - N, N' metileno-bis-acrilamida
Tris - tris (hidroxilmetil) aminometano
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico
 NH_4HCO_3 - Tampão bicarbonato de amônio
PLA2 - Fosfolipase A₂
PM - Peso Molecular
CM - grupo carboximetil
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Sulfato de cobre penta hidratado
NaOH - Hidróxido de sódio
KOH - Hidróxido de potássio
 CaCl_2 - Cloreto de cálcio
mA - miliâmperes
SP- grupo sulfopropil

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo purificar a proteína miotóxica de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e analisá-la quanto à massa molecular, atividade fosfolipásica e atividade miotóxica. Duas cromatografias foram realizadas para que pudessemos encontrar as melhores condições para purificar a miotoxina. Na primeira cromatografia realizada em SP-Sephadex C-25 em tampão acetato de amônio 0,05M pH 5,5 foram encontradas onze frações protéicas (N1 a N10), estas foram analisadas quanto ao perfil eletroforético e atividades biológicas. Mas devido à grande quantidade de sal existente nas amostras não foi possível trabalhar com este material. Em uma segunda cromatografia realizada em CM-Sephadex C-25 em tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8,0, foram encontrados seis picos de absorbância a 280nm designados P1 a P6. Estas frações foram analisadas, apresentando um perfil eletroforético satisfatório. A atividade fosfolipásica foi encontrada apenas no pico P1. Em géis de poliacrilamida com e sem agentes desnaturantes a fração P5 apresentou banda única semelhante a fosfolipase A2. Como não foi observada atividade fosfolipásica para a fração P5, testou-se a atividade miotóxica. Estudos histológicos mostraram alterações no tecido muscular estriado esquelético, degeneração, necrose celular e grande quantidade de leucócitos, caracterizando assim uma inflamação ocasionada por esta proteína. Com estes resultados pode-se afirmar que a fração P5 é uma proteína miotóxica de caráter básico, com peso molecular de aproximadamente 15 kDa e que não apresenta atividade fosfolipase A2 sobre substrato artificial..

Palavras chaves: Miotoxina, fosfolipase A2, Peçonha de serpente, *Bothrops neuwiedi pauloensis*, estudo histológico.

1 – INTRODUÇÃO

Na fauna brasileira existem nove famílias de serpentes, dentre as quais somente duas são consideradas peçonhentas e responsáveis pela quase totalidade dos acidentes: Elapidae e Viperidae (Klemmer, 1963).

A família Viperidae no Brasil compreende as principais serpentes peçonhentas representadas pelos gêneros: *Bothrops* (jararaca, jararacussu, moojeni, etc), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucu).

As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo território nacional, sendo responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos (Rosenfeld, 1971; Ferreira, 1992; Ribeiro, *et al*, 1993). Os componentes dos venenos são carboidratos, lipídeos, metais, peptídeos, diversos íons e mais de 90% de seu peso seco é constituído por proteínas compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas (Bieber, 1979). Os principais componentes das peçonhas que tem sido relacionado com o envenenamento botrópico são: fosfolipases, miotoxinas, fatores coagulantes, anticoagulantes, proteases e hemorraginas.

Em 1787 Fontana, como citado por Weiss *et al.* (1969) foi, provavelmente, o primeiro a mostrar que muitos venenos de serpentes possuem habilidade de coagular o sangue humano e animal “*in vitro*”. Eagle (1937) fez um extenso estudo e mostrou que muitos venenos da família Crotalidae coagulavam o plasma citratado de cavalo indicando que a coagulação

não era devida à conversão de protrombrina em trombina, pois esta reação necessitava de íons Ca^{2+} . Posteriormente estes e outros estudos mostraram que esta habilidade de coagular o sangue era devida a ação direta do veneno sobre o fibrinogênio.

O estudo do mecanismo de coagulação com o veneno bruto é extremamente complicado devido à sua natureza heterogênea e o comportamento antagônico dos diferentes componentes.

Denson (1969) classificou as diferentes atividades coagulantes dos venenos em um sistema contínuo de enzimas semelhante ao sistema em cascata proposto para a coagulação sangüínea. Estas toxinas, no entanto, embora sejam enzimas proteolíticas, apresentam diferentes especificidades catalíticas (Iwanaga e Suzuki, 1979; Seegers e Ouyang, 1979; Kornalik, 1990).

Destaca-se aí a ação das toxinas coagulantes conhecidas como “thrombin-like” que são serinoproteases com ação semelhante à trombina, causando a formação do coágulo de fibrina por atuarem na fase final do processo de coagulação do sangue.

A atividade “thrombin-like” foi detectada na maioria dos venenos Viperidae, não sendo encontrada nos venenos Elapidae e Hydrophiidae, com exceção de algumas Elapidae australianas (Eagle, 1937; Denson *et al.*, 1971).

No Brasil, os estudos têm sido realizados principalmente com as peçonhas das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Diversas enzimas “thrombin-like” já foram isoladas e caracterizadas, destacando-se a enzima coagulante de *B. atrox* e subespécies, designada batroxobina (Stocker e Barlow, 1976) por sua grande utilização como agente desfibrinogenante, comercializada pela Pentapharm Ltda na Europa e Ásia desde 1954 (Seegers e Ouyang, 1979).

Estas enzimas que possuem atividade tipo trombina apresentam a capacidade de atuar sobre a molécula de fibrinogênio encontrada no plasma, transformando-a diretamente em fibrina (Seegers e Ouyang, 1979).

Mais recentemente, Andrião-Escarso (1996) isolou e caracterizou quimicamente um fator coagulante do veneno de *Bothrops jararacussu*.

As proteases presentes no veneno também são responsáveis por um dos mais sérios efeitos da picada das serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae, que é a hemorragia. Um grande número de metaloproteases tem sido isolado de diferentes venenos e caracterizado como hemorraginas. As metaloproteases destas peçonhas podem ser classificadas em dois tipos, conforme a especificidade ao substrato: enzimas de alta especificidade ao substrato e que induzem hemorragia quando injetadas em animais (Mandelbaum *et al.*, 1982) e enzimas com ampla especificidade de substrato que não induzem hemorragia (Assakura *et al.*, 1985).

A atividade hemorrágica das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* da Argentina foi estudada juntamente com as alterações histológicas causadas em camundongos. Foi encontrada maior atividade hemorrágica para o veneno de *Bothrops neuwiedi* diporus, seguido por *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops jararaca*.

Do veneno de *Bothrops neuwiedi* do Brasil já foram isolados dois fatores hemorrágicos denominados NHFa e NHFb. São proteínas ácidas de pI. 4,2 e 4,3 e contém uma única cadeia polipeptídica de peso molecular de 46.000 e 58.000, respectivamente (Mandelbaum *et al.*, 1984). Estas toxinas são altamente hemorrágicas e apresentam dose mínima hemorrágica de 4.8 ng para NHFa e 0.2 ng para NHFb (Mandelbaum *et al.*, 1985).

Muitos fatores hemorrágicos também já foram isolados e caracterizados, tais como BH1, BH2 e BH3 que são proteínas com peso molecular de 64.000, 26.000 e 55.000, respectivamente de *B. asper* (Borkow *et al.*, 1993) e a protease A de *B. moojeni* com peso molecular de 20.400 (Assakura *et al.*, 1985).

Ao mesmo tempo, grande parte da ação tóxica destas peçonhas é atribuída a um grupo de enzimas, as fosfolipases A2 (PLA2). Estas enzimas estão largamente distribuídas na natureza e são encontradas em ambos os meios intra e extracelular. Ex: répteis, mamíferos, insetos.

Estas enzimas são proteínas compactas de aproximadamente 14 kDa e estão presentes em grande concentração em secreções glandulares como a pancreática e venenos de abelhas, serpentes e escorpiões.

Nos venenos de serpentes, as fosfolipases são capazes de induzir vários efeitos biológicos como: neurotoxicidade pré/pós sináptica, cardiotoxicidade, miotoxicidade, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão e hipotensão (Kini e Evans, 1989).

Durante os últimos anos, tem crescido o interesse no estudo dos componentes do veneno que são responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação. Como resultado algumas miotoxinas de venenos botrópicos foram isoladas e caracterizadas e muitos progressos têm sido feito para entender o mecanismo de ação e patogênese da mionecrose (Gutierrez e Lomonte, 1995).

A mionecrose é um dos principais efeitos locais, causado pelo envenenamento botrópico e atribuído a um grupo de toxinas designadas miotoxinas, que geralmente são fosfolipases A2 básicas, com ponto isoelétrico variando entre 7.0 e 10.0, que podem ou não apresentar atividade catalítica sobre substratos artificiais como a gema de ovo (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

Este efeito pode ser devido à ação direta de miotoxinas sobre a membrana plasmática de células musculares ou por uma ação indireta, causada por hemorraginas, que provocariam danos vasculares, levando à depleção do sangue, induzindo isquemia e conseqüentemente à morte celular. Em ambos os casos as miofibrilas são drasticamente afetadas como uma conseqüência da ação do veneno (Mebs e Ownby, 1985).

Miotoxina é o termo usado para definir um componente capaz de causar danos no músculo esquelético e degeneração. A degeneração muscular envolve a quebra da arquitetura normal das fibras musculares, o arranjo do material contrátil em sarcômeros é desfeito e ocorre a desintegração de miofibrilas em miofilamentos (Harris, 1995).

Mebs (1985) listou quinze fosfolipases miotóxicas com habilidade de causar danos no músculo esquelético. Os efeitos característicos das PLA2 miotóxicas, segundo Harris (1991) são: (a) 0-1h: edema confinado ao espaço extravascular; (b) 1-3h: degeneração e

hipercontração das miofibrilas e acúmulo de fagócitos na luz dos vasos sanguíneos e no espaço perivascular; (c) 3-6h: invasão das fibras musculares necrosadas pelas células fagocíticas, colapso do potencial das fibras musculares e ruptura da membrana sarcoplasmática; (d) 6-24h: degeneração total das fibras musculares individuais. Estas enzimas podem destruir os terminais nervo-motores dos músculos, mas não interferem com as arteríolas, capilares, vênulas ou nervos intramusculares.

O isolamento de miotoxinas de venenos botrópicos no Brasil teve início no final da década de 80, com o trabalho de Homsí-Brandeburgo *et al.* (1988) que isolaram duas miotoxinas da peçonha de *B. jararacussu* denominadas BthTx I, a qual não possui atividade fosfolipásica A2 e BthTx II com atividade fosfolipásica residual.

Atualmente são conhecidas diversas miotoxinas de peçonhas botrópicas tais como piratoxinas I e II de *B. pirajai* (Mancuso *et al.*, 1995) e duas miotoxinas do veneno de *B. moojeni* (Soares *et al.*, 1998).

No Triângulo Mineiro, na região de Uberlândia, os acidentes ofídicos causados por serpentes botrópicas são devidos principalmente às serpentes *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (Nishioka e Silveira, 1992).

O gênero *Bothrops* compreende vinte espécies. A espécie *B. neuwiedi* conhecida por jararaca pintada ou boca de sapo foi descrita por Amaral (1925), segundo Peters e Orejas Miranda (1970) e se divide em doze subespécies que habitam preferencialmente áreas secas e tem larga distribuição no Sudeste do Brasil.

Recentemente, Rodrigues *et al.* (1998) mostraram num elegante trabalho a variabilidade na composição de miotoxinas quando a peçonha havia sido coletada de exemplares de *B. neuwiedi pauloensis* do estado de Minas Gerais (BnMG) e do estado de São Paulo (BnSP).

A relação estrutura e função de diversas miotoxinas homólogas a PLA2 de venenos de serpentes botrópicas tem sido amplamente pesquisadas. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação destas enzimas multifuncionais, várias metodologias tem sido largamente empregadas como modificações químicas em aminoácidos, estudo de ligação com inibidores e substratos naturais e artificiais.

2 – OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi purificar a proteína miotóxica do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e caracterizá-la bioquimicamente quanto à massa molecular, grau de pureza e atividade fosfolipásica. Avaliar a atividade biológica desta toxina sobre o tecido muscular estriado esquelético utilizando a microscopia de luz.

3 – MATERIAL

3.1 - Obtenção da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

As peçonhas usadas neste trabalho foram extraídas de serpentes capturadas e mantidas em cativeiro, na região de Uberlândia, pela Pentapharm do Brasil e cedidas pela Prof^a Vera Brites do Instituto de Biologia. Após dessecar a vácuo, os cristais foram conservados a – 20°C.

3.2 - Materiais para cromatografia, eletroforese, dosagem protéica, atividade enzimática, atividade coagulante.

SP-Sephadex C-25 e CM-Sephadex C-25 (Amersham Pharmacia Biotech).

Acrilamida, Bis-Acrilamida, Temed, SDS, Coomassie Brilliant Blue R250, EDTA, Soroalbumina Bovina, Azul de Bromofenol, Beta-Mercaptoetanol, Persulfato de Amônio e Desoxicolato de Sódio. Padrões para determinação dos pesos moleculares: Soroalbumina Bovina (PM 66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (PM 36.000), Anidrase Carbônica Bovina (PM 29.000) Tripsinogênio de Pâncreas Bovino (PM 24.000), Inibidor de Tripsina (PM 20.000), Alfa-Lactoalbumina (PM 14.200), foram adquiridos da Sigma Chem. Co.

Plasma Bovino foi doado gentilmente pelo Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia-UFU.

3.3 -Animais.

Foram utilizados 5 camundongos machos Swiss cedidos pela Pentapharm e mantidos no Laboratório de Bioquímica da UFU.

Os demais reagentes usados neste trabalho eram de grau analítico.

4 – MÉTODOS

4.1 - Determinação da Quantidade de Proteínas

As dosagens de proteínas em solução contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas/ml foram realizadas pelo método do microbiureto segundo Itzhaki e Gill, 1964, como descrito a seguir. Foram pesados 2 mg da peçonha bruta liofilizada, diluídos em 500µl de salina e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 26°C. Do sobrenadante foram retirados 100µl para dosagem. Essa amostra recebeu 1900µl de água desionizada, foi levada ao espectrofotômetro e lida a uma absorbância de 280nm. Após, essa amostra foi dividida em dois tubos de ensaio, sendo que um deles recebeu 1ml da solução contendo a peçonha bruta, 1ml de água e 1 ml de reagente R1 (solução a 0,21% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em NaOH 30,4%) e o outro recebeu 1 ml da solução de peçonha bruta, 1 ml de água e 1 ml de reagente R2 (solução de NaOH a 30%). Essas duas amostras foram levadas ao espectrofotômetro para se fazer a leitura a uma absorbância de 310nm contra dois brancos que não continham a solução de peçonha bruta. Após a dosagem, o material restante foi separado em alíquotas de 100 e 200 µg que posteriormente foram liofilizadas e armazenadas a - 20°C para novos ensaios.

4.2 - Estudo da termoestabilidade da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

4.2.1 - Preparação das amostras para estudo de estabilidade.

Amostras da peçonha contendo 100 ou 200 µg de proteínas foram dissolvidas em tampão formato de amônio pH 3.5 ou em água desionizada pH 7.0, divididas em duas alíquotas cada e uma delas submetida a 100°C por dois minutos. Após esse procedimento fez-se a centrifugação do material e o sobrenadante foi utilizado para ensaios posteriores.

4.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes.

As eletroforeses foram realizadas segundo o método de Laemmli (1970) utilizando-se géis de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio). Dois espaçadores em forma de fita são utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 0,2mm de espessura, as placas de vidro utilizadas na preparação dos géis medem aproximadamente 10 cm de largura, 10,5 cm de comprimento e 0,1 cm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que foi preenchida com a solução do gel. Na preparação do gel a 16% utilizaram-se as seguintes soluções:

Soluções de Estoque	Gel de Separação	Gel de Empilhamento
Tris-HCl 2M pH 8.8	1170µl	---
Tris-HCl 2M pH 6.8	---	250µl
EDTA 200mM	63µl	40µl
Acrilamida:Bis(30:0.8)	3320µl	650µl
Água Desionizada	1550µl	2960µl
Temed	7.5µl	5µl
Persulfato de amônio 10%	37.5µl	35µl

Terminada a polimerização, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletroforese foi conduzida a 20mA de corrente, por aproximadamente 80 minutos. Foram utilizados marcadores de peso molecular citado no item 3.2.

A solução de trizma base 0,1M, EDTA 7.8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% pH 8.3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução porém sem glicina para o ânodo.

As amostras preparadas como descrito no item 4.2.1 e contendo cerca de 200µg de proteínas foram dissolvidas em 100µl do tampão STOP (Tris-HCl 187mM pH 6.8, SDS 6%, EDTA 6mM, Azul de Bromofenol 1% e glicerol 27%) e 10µl de beta-mercaptoetanol, aquecidas por 2 minutos a 100°C e 15µl desta solução foi aplicada aos poços do gel.

Após a eletroforese, o gel foi retirado da placa e colocado em uma solução fixadora (Metanol 50%, Ácido acético 10% e água desionizada) por 5 minutos. Em seguida foi retirado desta solução e colocado em uma solução corante contendo Coomassie Brilliant Blue R250 a 2,5% e deixado cerca de 10 minutos. Após este procedimento retirou-se do corante e colocou-se em uma solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30% e água desionizada).

Em seguida os géis foram prensados entre duas folhas de papel celofane poroso, em bastidores fixados por garras e deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 dias para secagem. Após a secagem dos géis estes foram analisados e fotografados.

4.3 - Ensaios Biológicos.

4.3.1 - Atividade Fosfolipásica.

Foi determinado por titulação potenciométrica segundo o método descrito por De Haas *et al.* (1968). Como substrato foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema em 50 ml de água desionizada) em presença de desoxicolato de sódio e cloreto de cálcio, como segue: 15 ml da emulsão aquosa de gema de ovo, 10 ml de desoxicolato de sódio a 0,03M, 1 ml de cloreto de cálcio a 0,6M e o volume foi completado para 100 ml com água desionizada.

Para cada ensaio foram utilizados 10 ml desta solução de trabalho e 10 μ g de proteínas dosadas e preparadas como descrito no item 4.2.1.

A liberação enzimática de ácidos graxos foi titulada com NaOH a 0,1208N. O resultado final da atividade foi calculado em μ eq/mg/min de base consumida. Por definição 1 unidade de atividade específica PLA2, corresponde ao consumo de 1 microequivalente de base por mg de proteínas em um minuto.

4.3.2 - Atividade Hemorrágica.

Esta técnica foi realizada segundo Nikai *et al.* (1984). Alíquotas contendo 50 μ g de proteína da peçonha bruta foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) em um volume final de 50 μ l de solução, tratadas ou não a 100 $^{\circ}$ C em pH 7,0 por 5 minutos e aplicadas intradermicamente no dorso de camundongos, ligeiramente anestesiados com éter. Após três horas de inoculação, os animais foram sacrificados, as peles do dorso removidas. As presenças de halos hemorrágicos na superfície internas da pele indicam a atividade positiva.

4.3.3 - Atividade Coagulante.

Amostras tratadas ou não a 100 $^{\circ}$ C por 5 minutos e contendo cerca de 10 μ g de proteínas foram diluídas para um volume final de 10 μ l em salina (NaCl 0,9%) e aplicadas em 200 μ l de plasma bovino previamente incubados em banho-maria a 37 $^{\circ}$ C.

A atividade é caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com tempo de coagulação do controle (NaCl 0,9% e CaCl₂ 0,6M).

4.4 - Fracionamento em SP-Sephadex C-25 das toxinas termoestáveis da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

4.4.1 - Preparação da Resina.

A resina SP-Sephadex C-25 foi, inicialmente, lavada em 0,5 ml de solução de NaOH 0,1N, em funil de placa sinterizada sob pressão reduzida e depois, exaustivamente, lavada com água destilada e desionizada até o pH atingir a neutralidade. O mesmo processo foi

repetido utilizando-se, no entanto, HCl 0,1N. Após este tratamento a resina foi suspensa em tampão acetato de amônio 0,05M pH 5.5 e deaerada.

Uma coluna de 54 x 1.2 cm de dimensões foi preenchida com o gel assim preparado e lavada com o mesmo tampão até o equilíbrio do pH e da força iônica.

Após o uso a resina foi reciclada como descrito acima e armazenada a 4°C na presença de solução de azida sódica a 0,02%.

4.4.2 - Preparação e Aplicação da Amostra.

Cerca de 100mg da peçonha bruta foram ressuspensas em 2,0 ml de tampão acetato de amônio 0,05M pH 5,5 e centrifugados a baixa rotação (6.500 rpm) por 10 minutos. A solução sobrenadante foi submetida ao aquecimento por 5 minutos a 100°C e centrifugadas novamente. Desta solução foram retirados 200µl para dosagem de proteínas e testes enzimáticos. O restante foi aplicado à coluna.

A eluição foi realizada a temperatura ambiente tendo início com o tampão de equilíbrio (acetato de amônio 0,05M pH 5,5) contido em um funil de separação situado a um nível superior e ligado a um kitassato, contendo 125ml deste tampão inicial sob agitação constante e diretamente ligado à coluna.

Posteriormente, o tampão do funil foi trocado por um tampão acetato de amônio 0.05M pH5.5 contendo NaCl 1.0M e iniciando assim um gradiente convexo de concentração molar.

Foram coletadas frações de 3ml/tubo num fluxo de 20ml/hora, em um coletor de frações da Gilson. A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280nm, num espectrofotômetro da SPEKOL, o gráfico traçado e os pools delimitados. Essas frações foram reunidas, liofilizadas e armazenadas para ensaios posteriores.

4.5 - Fracionamento da Peçonha Bruta por Cromatografias de Troca de Iônica.

4.5.1 - Cromatografia em SP-Sephadex C-25.

A resina foi reciclada e empacotada como descrito no item 4.4.1. Neste fracionamento, 170mg de peçonha foram preparadas e aplicadas exatamente como descrito no item 4.4.2, porém sem tratar a amostra à 100°C por 5 minutos.

4.5.2 - Cromatografia em CM-Sepahadex C-25.

A resina foi reciclada e empacotada segundo instruções do fabricante. Neste fracionamento 250 mg de peçonha foram dissolvidos em 1,5 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 8.0 e centrifugados a baixa rotação (6.500 rpm) por 10 minutos. Da solução sobrenadante foram retirados 200µl para ensaios posteriores e o restante aplicado à coluna. O gradiente foi realizado usando o tampão bicarbonato de amônio 0,5M pH 8,0.

4.6 - Critérios de Pureza.

Foram realizadas eletroforeses para proteínas ácidas e básicas para análise de pureza das frações obtidas nas cromatografias de troca iônica.

4.6.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) para Proteínas Básicas.

Esta eletroforese segue a técnica descrita por Reisfeld (1962), com poucas modificações.

Na preparação dos géis a 10% foram utilizadas as seguintes soluções:

Soluções Estoques	Volume (µl)
Solução A	775
Solução C	2100
Água Desionizada	3375
Temed	20
Persulfato de amônio (10%)	50

A solução A é composta de KOH 1N (2,85g de KOH em 50ml de água), sendo que 48ml dessa solução teve seu pH acertado para 4,5 com ácido acético glacial; em seguida, completou-se o volume da solução para 100ml com água desionizada.

A solução C foi preparada com 30g de acrilamida e 0,2g de bis-acrilamida, dissolvidos em água desionizada para 100ml de solução.

A solução do eletrodo era constituída de α -alanina e ácido acético 0,35M pH 4,3 (solução estoque), sendo diluída 10 vezes no momento do uso.

As amostras contendo cerca de 100 μ g de proteínas, foram dissolvidas em 50 μ l do tampão do eletrodo e 5 μ l de glicerol. A fucsina básica foi utilizada como marcador de migração. As demais etapas foram realizadas como descrito no item 4.2.2.

4.6.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) para Proteínas Ácidas.

Esta eletroforese surgiu da técnica descrita por Laemmli (1970) e Davis (1964), com algumas modificações.

Na preparação dos géis a 10% utilizou-se as seguintes soluções:

Soluções Estoque	Volume (μ l)
Tris-HCl 2M pH 8.8	1170
EDTA 200mM	63
Acrilamida-Bis (30:0.8)	2070
Água Desionizada	2800
Temed	7.5
Persulfato de Amônio (10%)	38

A solução do eletrodo era constituída por Tris-glicina (Tris 10mM e glicina 77mM pH 8,3) diluída 10 vezes, tanto para o cátodo quanto para o ânodo.

As amostras contendo cerca de 100µg de proteínas foram dissolvidas em 50µl do tampão do eletrodo já diluído e 5µl de glicerol. O azul de bromofenol foi utilizado como marcador de migração. Os demais procedimentos foram realizados como descrito no item 4.2.2.

4.7 – Microscopia de Luz.

4.7.1 – Estudo histológico do músculo gastrocnemius sob a ação da peçonha bruta e fração

Três animais experimentais e dois animais controles receberam injeções intramusculares na região do músculo gastrocnemius direito de 50µg (em 50µl de salina) da peçonha bruta ou fração (P5) e apenas 50µl de salina respectivamente. Após 24 horas de inoculação os animais foram anestesiados profundamente com éter e sacrificados. Os fragmentos do músculo gastrocnemius direito foram retirados e fixados em mistura de etanol 95%, formol 30%, ácido acético glacial e água na proporção de 3:1:1:5 em volume durante 24 horas (Finn e McLaren, 1967). Após a fixação, seguiu-se a desidratação em uma série de álcoois em concentrações crescentes (50% a 100%), em seguida os fragmentos foram colocados em xilol, e posteriormente foram incluídos em parafina.

Cortes de 5µm de espessura foram obtidos utilizando o micrótomo. O material foi corado com hematoxilina e eosina montados entre lâmina e lâminula e examinado ao microscópio de luz. Os resultados foram documentados utilizando-se o fotomicroscópio (Polivar).

5 – RESULTADOS

5.1 - Estudo da Termoestabilidade da Peçonha Bruta.

A figura 1 mostra alguns resultados obtidos após eletroforese das peçonhas tratadas como descrito no item 4.2.1. Por estes resultados pode-se observar que na eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% em condições desnaturantes, não houve variações no perfil eletroforético da peçonha nos diferentes tratamentos.

5.1.1 - Atividade Fosfolipásica.

A tabela 1 apresenta os resultados da atividade PLA2, realizada como descrito no item 4.3.1, com amostras preparadas como descrito no item 4.2.1.

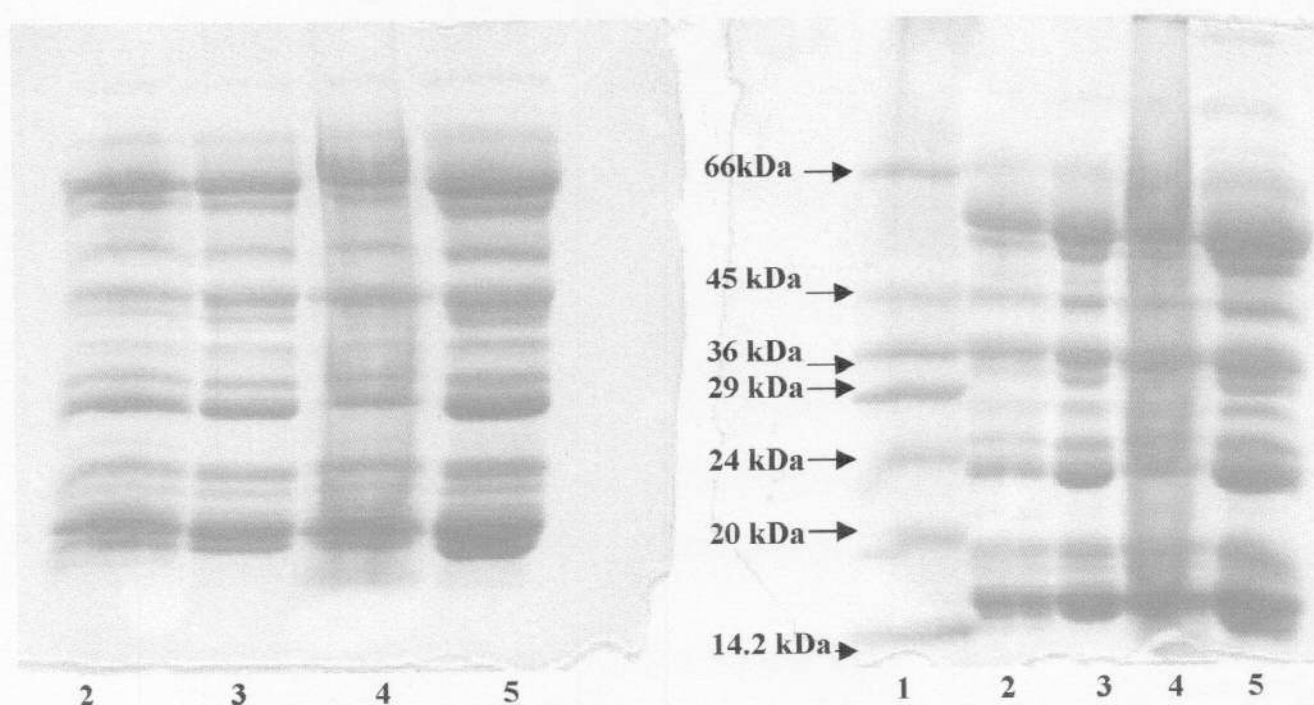


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% em condições desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Tampão de corrida: trizma base 0,1M, EDTA 7,8mM, glicina 0,77M e SDS 0,3% (p/v) PH 8,3 foi utilizado como tampão para o cátodo e a mesma solução porém sem glicina para o ânodo. Corrente 20mA; 200V. Tempo de corrida 60 minutos. Após terminado o tempo de corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% por 10 minutos, em seguida foi descorado em uma solução de ácido acético, metanol e água (40:50:10 v/v).

Legenda:

- 1 - Padrão de Peso Molecular (Albumina bovina-66kDa, Ovoalbumina-45kDa, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase-36kDa, Anidrase carbônica bovina-29kDa, Tripsinogênio de pâncreas bovino-24kDa, Inibidor de tripsina-20kDa, α -lactoalbumina-14.2kDa).
- 2 - Veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pH3.5 (não aquecido)
- 3 - Veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pH3.5 (aquecido)
- 4 - Veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pH7.0 (não aquecido)
- 5 - Veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pH7.0 (aquecido)

Tabela 1: Atividade Fosfolipásica de 10µg da Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* Aquecida ou Não a 100°C em Diferentes pHs.

UNIDADES DE ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)

Ensaio*	pH 3.5		pH 7.0	
	N.A	A	N.A	A
1	148	85	170	100
2	116	99	156	88
3	134	147	---	---
4	208	177	---	---
5	146	168	---	---
6	159	---	---	---
Média dos Ensaio	152	135	163	94

*Os resultados de cada ensaio são referentes à média de três (3) testes.

Legenda:

N.A - Peçonha Não Aquecida

A - Peçonha Aquecida a 100°C por 5'

O substrato utilizado foi a gema de ovo. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH a 0,1208N durante 3 minutos.

Para melhor evidenciar estes resultados foi apresentada a figura 2, onde se pode observar que o pH ácido foi capaz de preservar a quase totalidade da atividade enzimática da peçonha bruta aquecida ou não, quando comparado com o pH neutro não aquecido.

Atividade PLA2 da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* aquecido e não aquecido

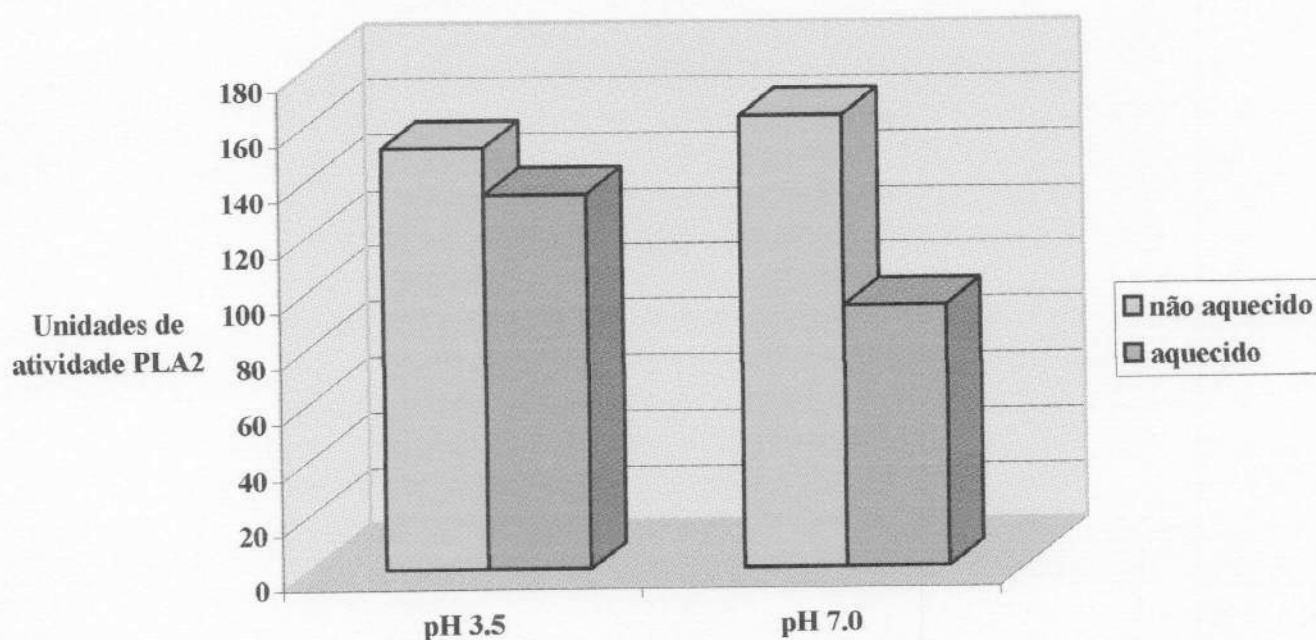


Figura 2: Atividade Fosfolipásica A2 da Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* Aquecida ou Não Aquecida a 100°C por 5 minutos.

Os resultados aqui apresentados correspondem à média total dos ensaios realizados. O substrato utilizado foi à gema de ovo e os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH a 0,1208N durante os 3 minutos iniciais da reação.

5.1.2 - Atividade Hemorrágica.

A figura 3 mostra a lesão causada quando 50µg de proteínas da peçonha bruta aquecida ou não foram aplicadas intradermicamente no dorso de camundongos conforme descrito no item 4.3.2. É interessante observar que o aquecimento não foi capaz de neutralizar totalmente a atividade hemorrágica da peçonha bruta.

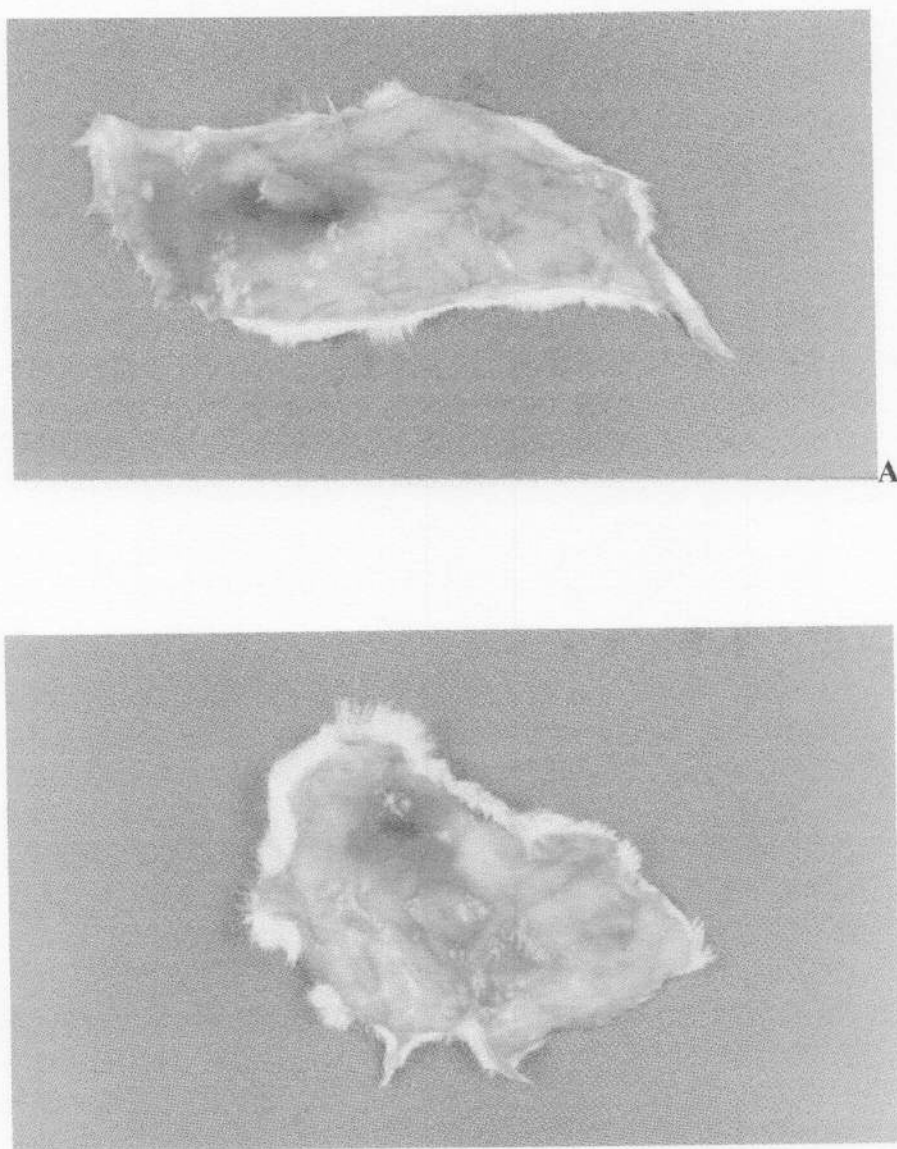


Figura 3: Atividade Hemorrágica de 50 μ g de Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* Aquecida e Não Aquecida a 100 $^{\circ}$ C por 5' em pH 7,0

Legenda:

A - Peçonha Bruta Não Aquecida

B - Peçonha Bruta Aquecida

5.1.3 - Atividade Coagulante.

A tabela 2 apresenta os resultados da atividade coagulante sobre o plasma bovino para a peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* comparando os tempos de coagulação das amostras aquecidas ou não a 100°C por 5' em pH 7,0.

Tabela 2: Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino para a Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em pH 7,0 e sob condições de não aquecimento e aquecimento a 100°C por 5'.

Ensaio	Tempo de Coagulação (s) *
Peçonha Bruta Não Aquecida	32,42
Peçonha Bruta Aquecida	109,43
CaCl ₂	220,69

* Média de três (3) ensaios.

Pode-se fazer uma análise destes resultados sob outro prisma, considerando-se que a peçonha bruta aquecida demorou 3,4 vezes mais tempo para coagular o plasma do que a peçonha sem aquecimento.

5.1.4 - Fracionamento em Gel de SP-Sephadex C-25 das Toxinas Termoestáveis da Peçonha Bruta.

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* preparada conforme descrito no item 4.4.2, foi realizado em gel de SP-Sephadex C-25 com tampão acetato de amônio a 0,05M pH 5.5. O perfil cromatográfico é mostrado na figura 4. A peçonha total foi resolvida em quatro picos de absorbância a 280nm, os quais foram designados P1, P2, P3 e P4. Ao longo deste a atividade PLA2 foi determinada, sendo detectada apenas no pico P1.

Os resultados de recuperação de proteínas e atividade PLA2 deste fracionamento são apresentados na tabela 3, a seguir.

Tabela 3: Rendimento Proteico e Recuperação da Atividade Fosfolipásica após o Fracionamento da Peçonha Bruta Aquecida em Gel de SP-Sephadex C-25

Amostra	Proteína*		Atividade Fosfolipásica**			
	mg (totais)	Recup. (%)	U/mg/min	U/totais	Recup. (%)	F. de purif.
V.B	9,6	100	19,7	189,1	100	---
P1	1,36	14,17	56,4	76,7	40,6	2,9
P2	0,98	10,21	---	---	---	---
P3	0,70	7,29	---	---	---	---
P4	1,32	13,75	---	---	---	---
Total	4,36	45,42	---	76,7	40,6	---

*Método do Microbiureto (Itzhaki e Gill, 1964).

**Método descrito por De Haas *et al.* (1968).

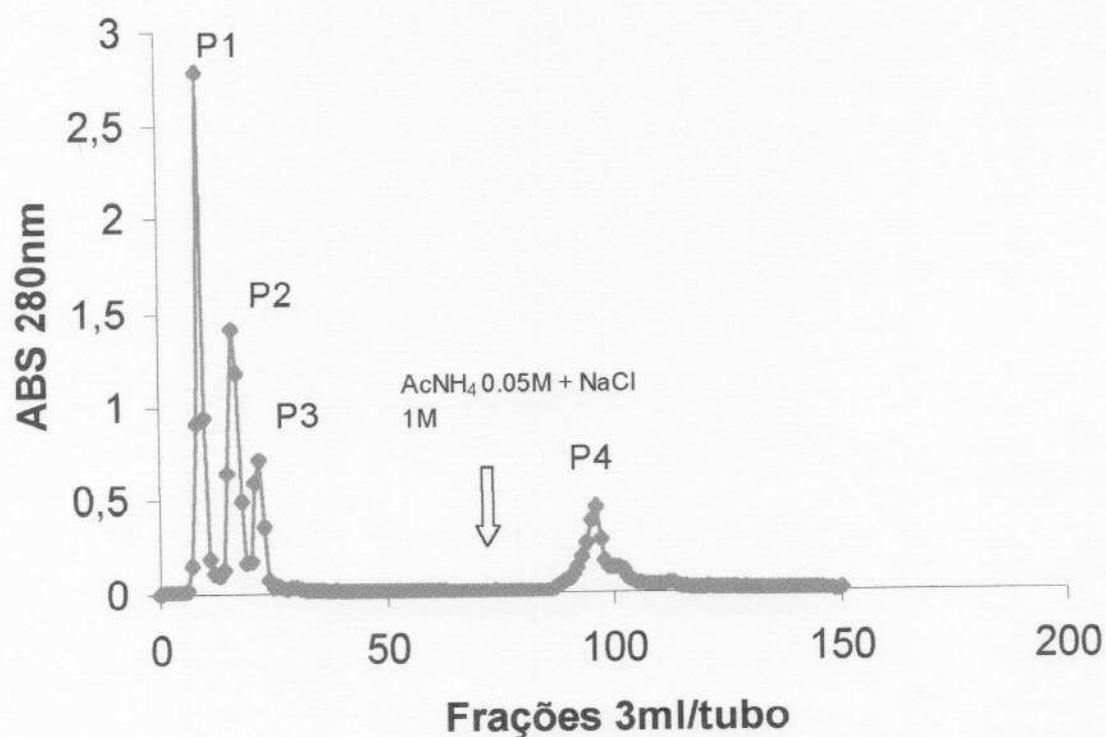


Figura 4: Cromatografia em SP-Sephadex C-25 de 100mg de Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* após aquecimento a 100⁰C por 5' pH 5,5. Coluna de 54 x 1,2 cm. Fluxo de 20ml/h. Volume de 3ml/tubo, temperatura ambiente (26⁰C), tampão acetato de amônio 0,05M pH 5.5. Gradiente convexo: acetato de amônio 0,05M pH 5.5 com NaCl 1M a partir do pico 3.

Legenda:

P1: tubos 7 a 12

P2: tubos 14 a 19

P3: tubos 20 a 24

P4: Tubos 92 a 106

5.2 - Purificação da Miotoxina de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

5.2.1 - Cromatografia em Gel de SP-Sephadex C-25.

O fracionamento da peçonha realizado como descrito no item 4.5.1, foi resolvido em onze frações proteicas, designadas N1, N2, N3, N4, N5, N6, N6', N7, N8, N9 e N10. Estes resultados estão apresentados na figura 5. A atividade PLA2 foi determinada, sendo encontrada nas frações N1, N4, N5, N6 e N6'. Na tabela 4 estão expressos os valores de rendimento proteico e atividade PLA2 específica após esta cromatografia.

Tabela 4: Rendimento Proteico e Recuperação da Atividade Fosfolipásica após o Fracionamento da Peçonha Bruta em Gel de SP-Sephadex C-25

Amostra	Proteína*		Atividade Fosfolipásica**			
	mg (total)	Recup.(%)	U/mg/min	U/totais	Recup.(%)	F. de purif.
VB	121,28	100	148	17949	100	---
N1	11,42	9,42	430	4910	23,35	2,9
N2	2,30	1,89	---	---	---	---
N3	10,00	8,25	---	---	---	---
N4	9,84	8,11	148	1456	8,11	1
N5	6,76	5,57	132	892,32	4,97	0,89
N6	8,75	7,21	39	341,25	1,90	0,26
N6'	9,50	7,86	53	503,5	2,80	0,35
N7	3,00	2,47	---	---	---	---
N8	1,32	1,08	---	---	---	---
N9	2,68	2,21	---	---	---	---
N10	1,10	1,00	---	---	---	---
TOTAL	66,67	55,04	---	8103,07	41,13	---

*Método do Microbiureto (Itzhaki e Gill, 1964).

**Método descrito por De Haas *et al.* (1968).

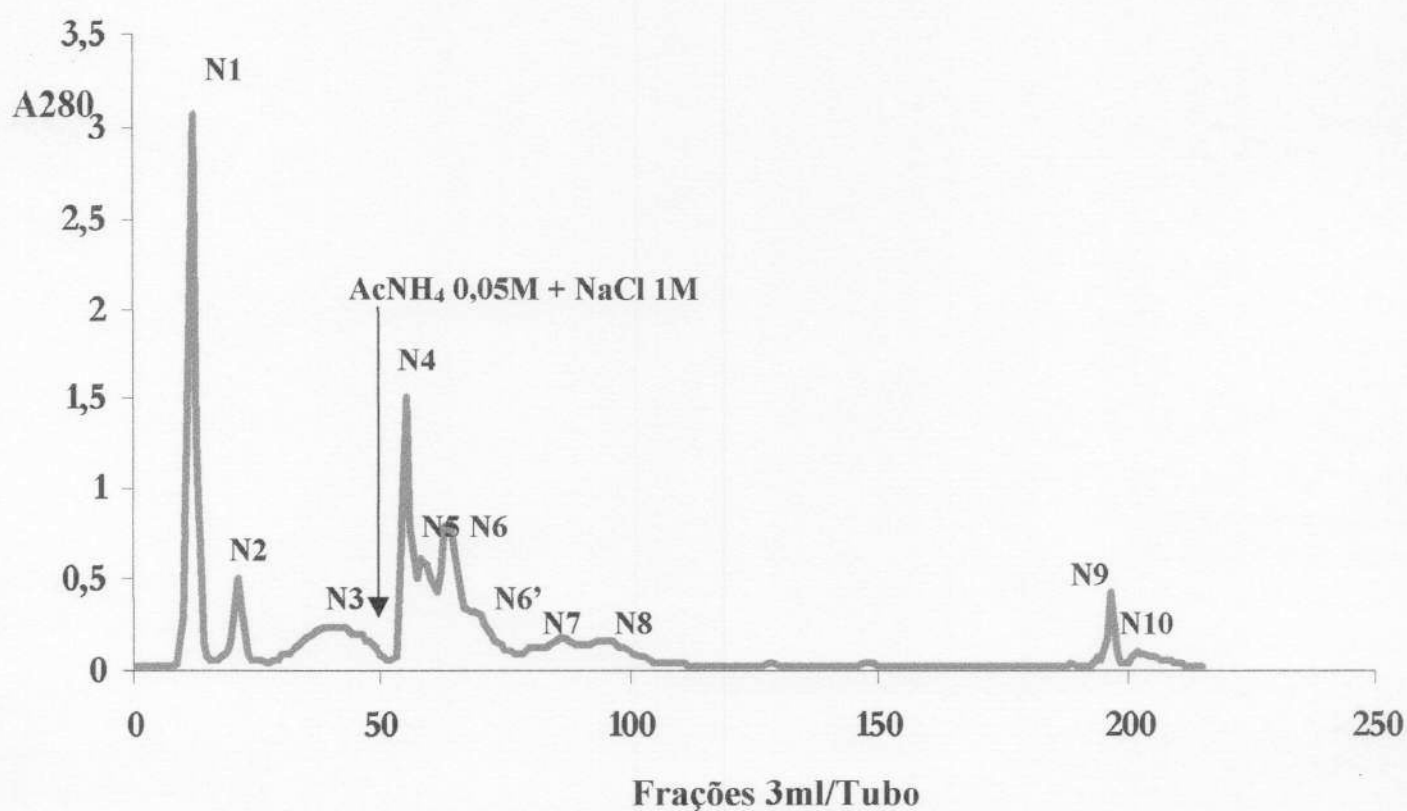


Figura 5: Cromatografia em SP-Sephadex C-25 da Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Coluna de 54 x 1,2 cm, equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05M pH 5,5, com fluxo de 20ml/h, coletadas frações de 3ml/tubo. Gradiente convexo: acetato de amônio 0,05M pH 5,5 + NaCl 1.0M à partir do pico N3.

5.2.1.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Agentes Desnaturantes.

Na figura 6 observa-se o perfil eletroforético das onze frações proteicas obtidas. As frações N3 e N8 apresentaram banda única, já para as frações N1, N2 e N10 não foi possível detectar bandas, devido a pequena quantidade de material aplicada nos poços dos géis.

5.2.1.2 - Atividade Fosfolipásica.

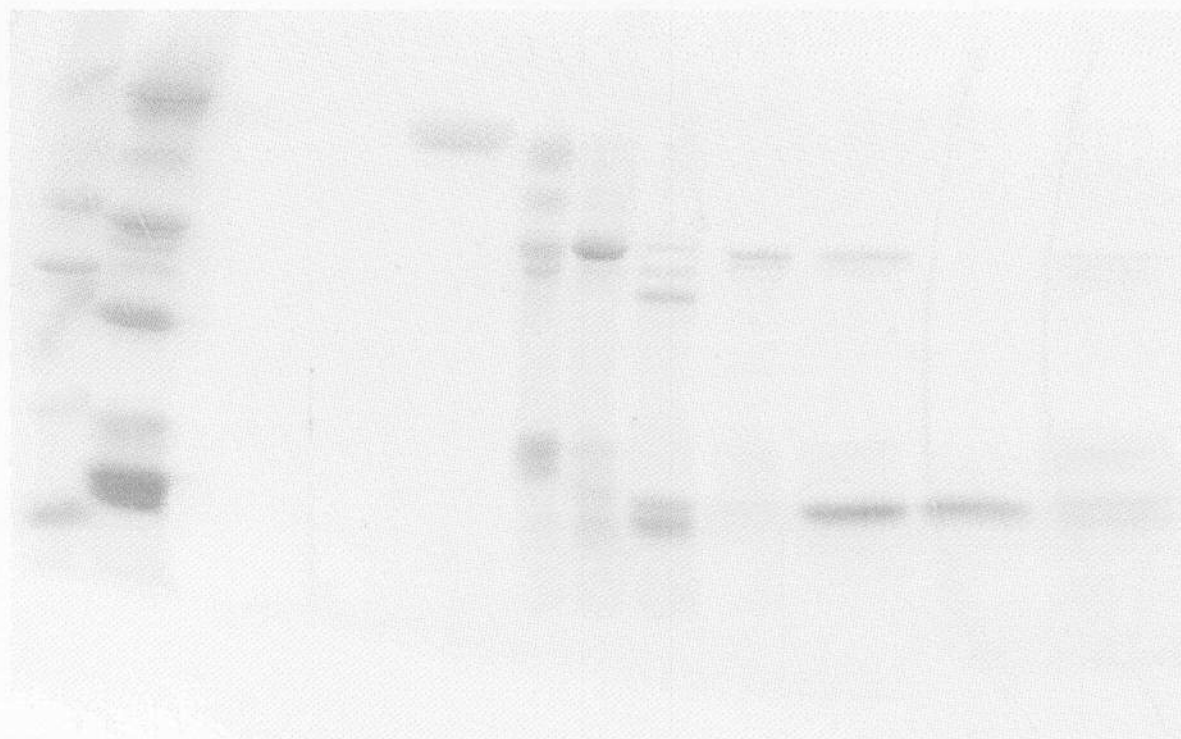
A atividade fosfolipásica foi determinada em triplicata por titulação pontenciométrica como descrito no item 4.3.1. Os resultados mostraram que a atividade fosfolipásica foi mais intensa na fração N1, apresentada na figura 7.

5.2.1.3 - Atividade Hemorrágica.

A figura 8 mostra a lesão causada quando doses de 50µg de proteínas da peçonha bruta e frações foram aplicadas intradermicamente no dorso de camundongos como descrito no item 4.3.2. A atividade hemorrágica foi encontrada nas frações N5 e N7, sendo mais intensa na fração N5.

5.2.1.4 - Atividade Coagulante.

A tabela 5 apresenta os resultados da atividade coagulante sobre o plasma bovino, para a peçonha bruta e suas frações. Pode-se observar que apenas as frações N4 e N5 apresentaram atividade positiva, quase 5 vezes menor que a da peçonha bruta.



P VB A B C D E F G H

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% em condições desnaturantes.

Tampão de corrida: trizma base 0,1M, EDTA 7,8mM, glicina 0,77M e SDS 0,3% (p/v) PH 8,3 foi utilizado como tampão para o cátodo e a mesma solução porém sem glicina para o ânodo. Corrente 20mA; 200V. Tempo de corrida 60 minutos. Após terminado o tempo de corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% por 10 minutos, em seguida foi descorado em uma solução de ácido acético, metanol e água (40:50:10 v/v).

Legenda:

1 - Padrão de Peso Molecular (Albumina bovina-66kDa, Ovoalbumina-45kDa, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase-36kDa, Anidrase carbônica bovina-29kDa, Tripsinogênio de pâncreas bovino-24kDa, Inibidor de tripsina-20kDa, α -lactoalbumina-14.2kDa)

VB - Veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis*

A - FraçãoN3

B - FraçãoN4

C - FraçãoN5

D - FraçãoN6

E - FraçãoN6'

F - FraçãoN7

G - FraçãoN8

H - FraçãoN9.

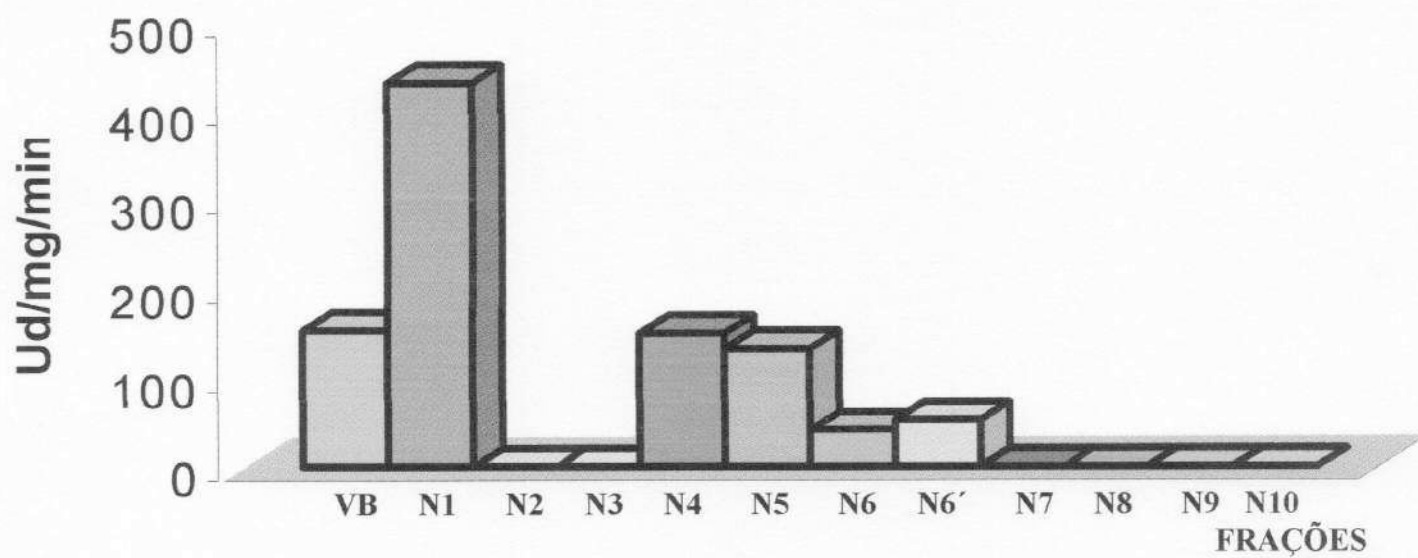


Figura 7: Atividade Fosfolipásica da Peçonha Bruta e Frações de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, realizada sobre emulsão de gema de ovo com 10 μ g de proteína. As amostras foram aplicadas ao substrato de reação pH 8.0 e tituladas com NaOH durante 3 minutos à temperatura ambiente.

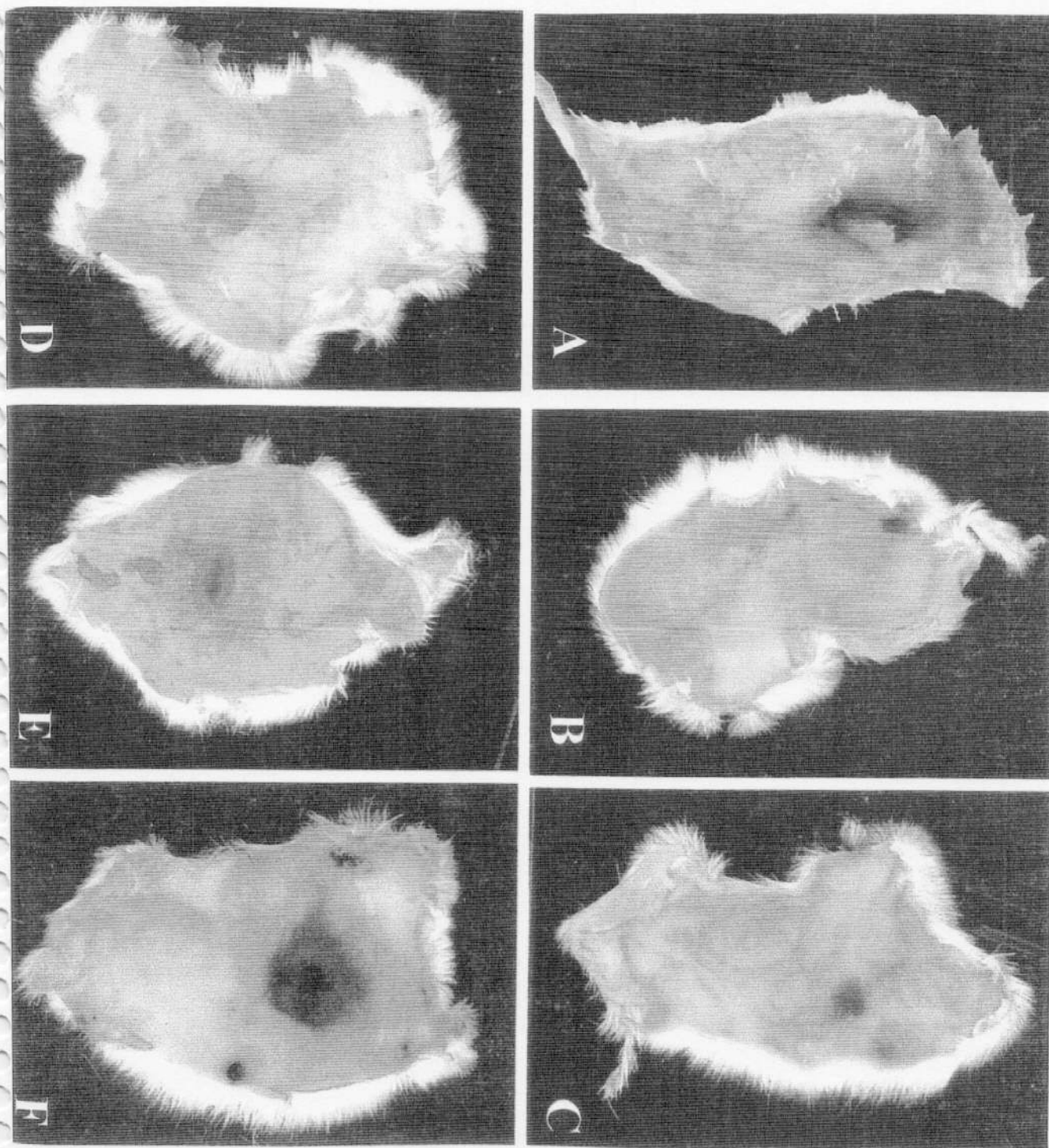


FIG 8: Atividade hemorrágica de 50 µg de peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e suas frações.

A-Peçonha Bruta	B- N1	C- N2	D- N3	E- N4
F- N5	G- N6	H- N6'	I- N7	J- N8
		L- N10		K- N9

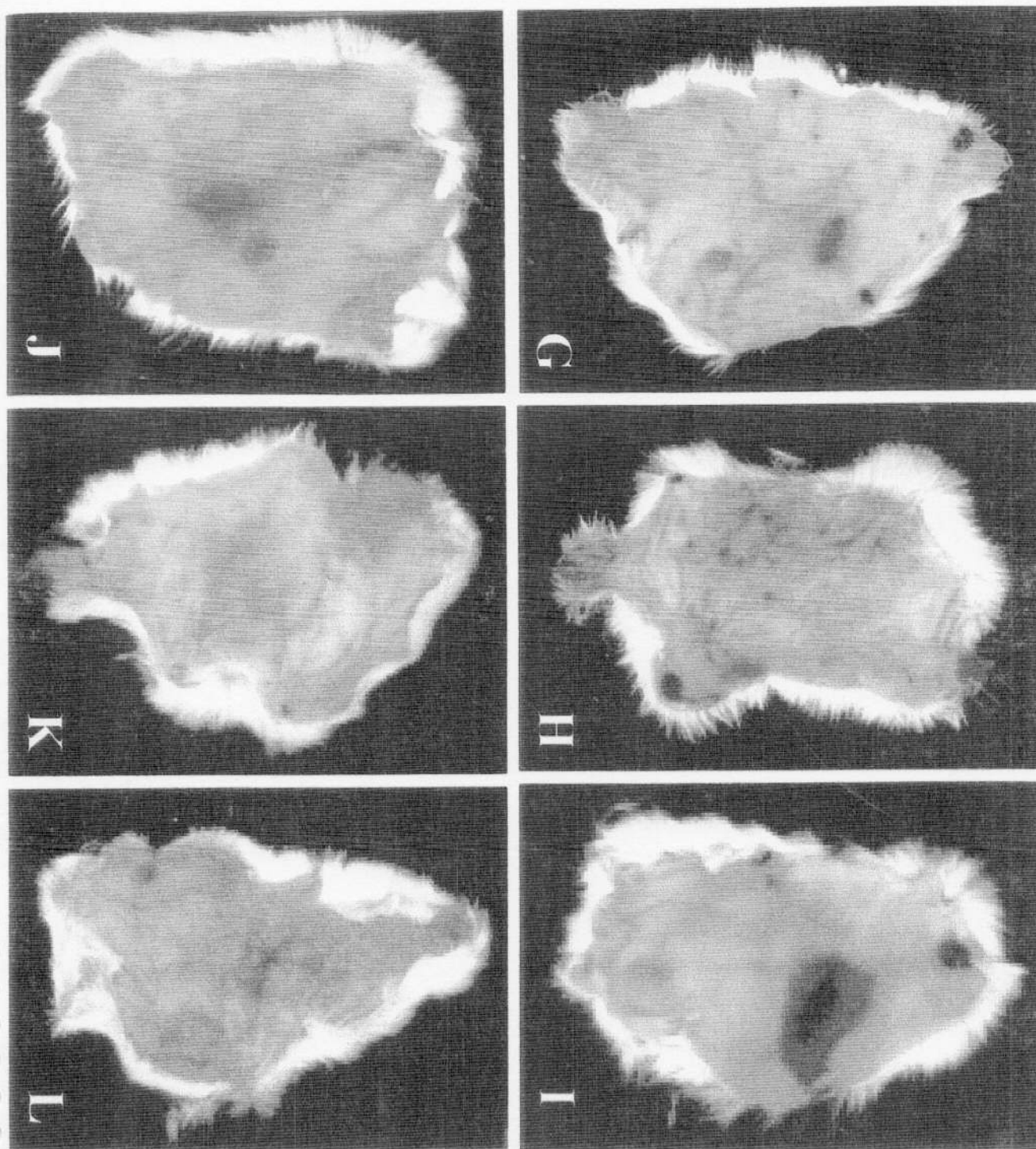


FIG 8: Atividade hemorrágica de 50 µg de peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e suas frações.

A-Peçonha Bruta

B- N1

C- N2

D- N3

E- N4

F- N5

G- N6

H- N6'

I- N7

J- N8

K- N9

L- N10

Tabela 5: Atividade Coagulante de 10µg de Peçonha Bruta e Frações, Sobre o Plasma Bovino à Temperatura de 37°C.

Ensaio	Tempo de Coagulação(s)*
VB	8,55
N1	---
N2	---
N3	---
N4	36,23
N5	43,33
N6	---
N6'	---
N7	---
N8	---
N9	---
N10	---

*O tempo de coagulação em segundos representa a média de três (3) ensaios.

5.2.2 - Cromatografia em CM-Sephadex C-25.

O terceiro fracionamento apresentado na figura 9 foi realizado como descrito no item 4.5.2 e mostra seis picos de absorbância a 280nm os quais foram designados P1, P2, P3, P4, P5 e P6. Ao longo deste perfil cromatográfico, a atividade fosfolipásica foi detectada somente no pico P1.

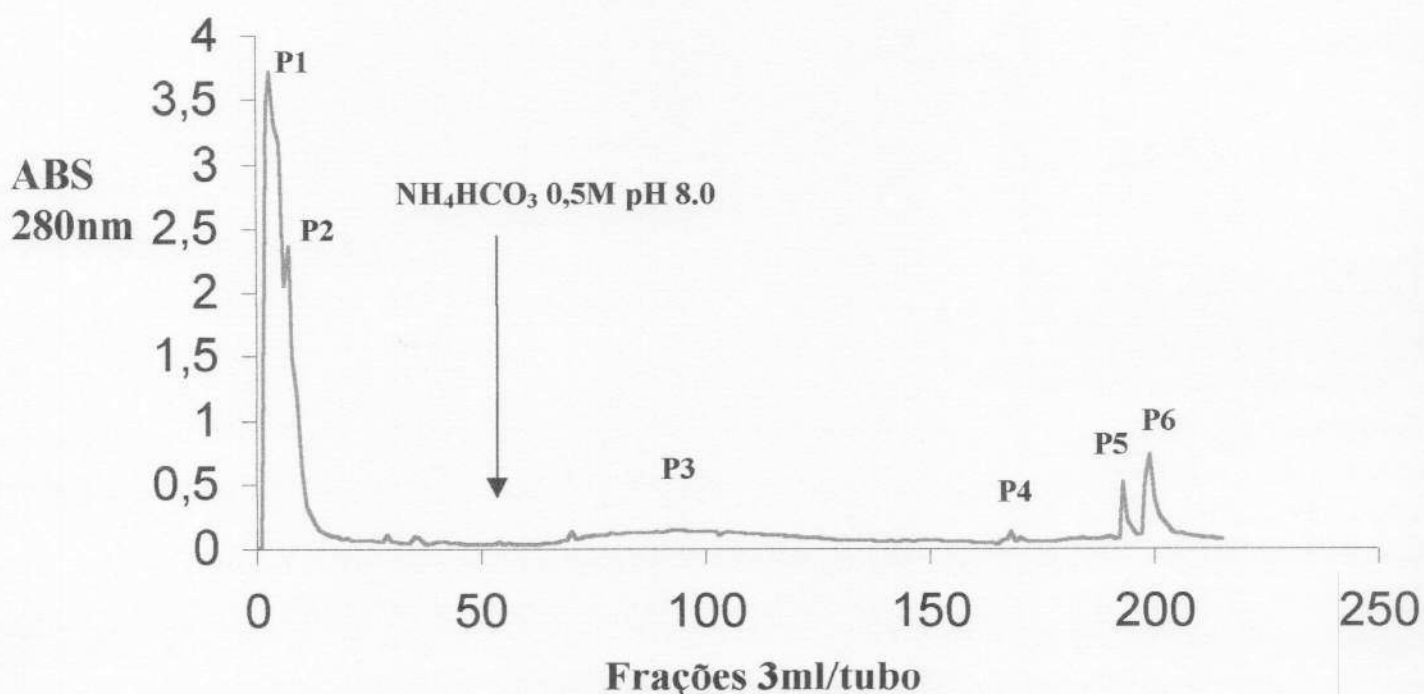


Figura 9: Cromatografia em CM-Sephadex C-25 da Peçonha Bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Coluna de 64 x 0,7 cm, equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 8,0, com fluxo de 20ml/h, coletadas frações de 3ml/tubo. Gradiente convexo: bicarbonato de amônio 0,5M pH 8,0

5.2.2.1- Análises Eletroforéticas.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Com Agentes Desnaturantes.

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes foi realizada para averiguar o peso molecular dos componentes de cada fração. Na figura 10a, pode-se evidenciar que as frações P1, P2 e P6 apresentaram muitas bandas, enquanto que as frações P3 e P4 não apresentaram bandas. A fração P5 apresentou uma única banda com baixo peso molecular em torno de 15kDa.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Sem Agentes Desnaturantes em pH Ácido

As frações obtidas foram analisadas quanto ao grau de pureza. Na figura 10b, pode-se observar que as frações P5 e P6 apresentaram bandas de maior migração eletroforética. Para as frações P3 e P4 também não foi possível detectar bandas.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Sem Agentes Desnaturantes em pH Alcalino.

Na figura 10c, pode-se observar que para as frações P3, P4, P5 e P6 não foi possível observar migração de bandas.

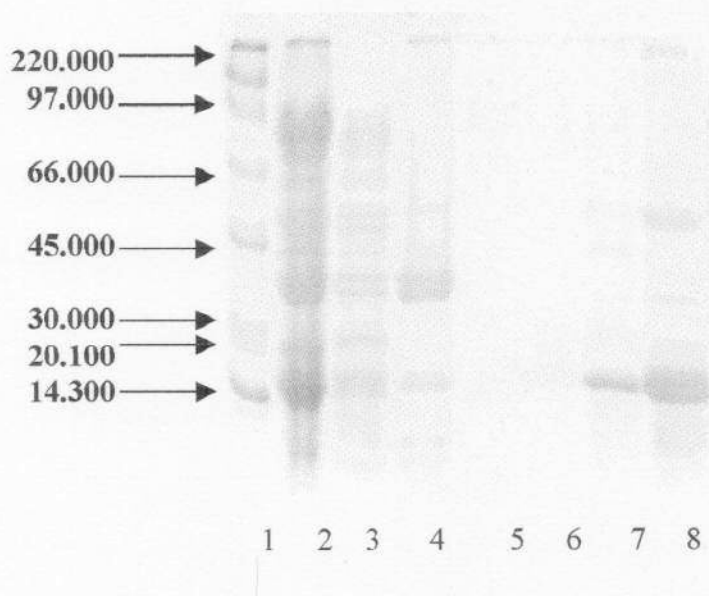


Figura 10a- Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes a 14% da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e das frações obtidas no fracionamento em gel CM-Sephadex C-25. Tampão de corrida: trizma base 0,1 M, EDTA 7,8mM, glicina 0,77M e SDS 0,3% (p/v) pH 8,3 foi utilizado como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina para o ânodo. Corrente 20mA; 200V. Tempo de corrida 60 minutos. Após terminado o tempo de corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% por 10 minutos, em seguida foi descorado em uma solução de ácido acético, metanol e água (40:50:10 v/v).

1- Padrão de peso molecular (Miosina – 220kDa, Fosforilase B – 97kDa, Albumina Bovina – 66kDa, Ovoalbumina – 45kDa, Anidrase Carbônica – 30kDa, Inibidor de tripsina – 20.1kDa, Lisozima – 14.3kDa). 2- Peçonha Bruta. 3- P1 4- P2 5- P3 6-P4 7- P5 8- P6

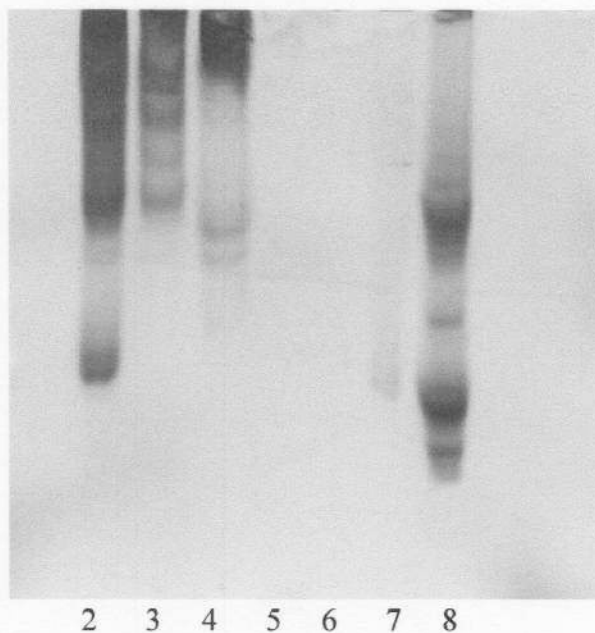


Figura 10b- Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes em pH ácido, segundo Reisfeld (1962), da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e frações obtidas em CM-Sephadex C-25. Gel à 10%, tampão β -alanina pH 4,5. 20 mA. 200V. Tempo de corrida 180 minutos. Demais condições idênticas a figura 10a. 2- Peçonha bruta 3- P1 4- P2 5- P3 6- P4 7- P5 8- P6



Figura 10c- Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes em pH alcalino, segundo Laemmli (1970), da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e frações obtidas em CM-Sephadex C-25. Gel a 10%, tampão Tris-HCl, pH 8,3. 20mA. 200V. Tempo de corrida 180 minutos. Demais condições idênticas a figura 10a. 2- Peçonha bruta 3- P1 4- P2 5- P3 6- P4 7- P5 8- P6

5.2.2.2 - Atividade Fosfolipásica.

O material eluído da coluna não foi quantificado quanto a concentração de proteínas⁹, por isso os resultados da tabela 6 estão sendo apresentados quanto à presença ou ausência de atividade PLA2.

Tabela 6: Relação da Peçonha Bruta e Frações Quanto à Presença ou Ausência de Atividade PLA2

Amostras	Atividade Fosfolipásica
VB	+
P1	+
P2	-
P3	-
P4	-
P5	-
P6	-

- Atividade Fosfolipásica Ausente

+ Atividade Fosfolipásica Presente

5.2.2.3 – Estudo histológico do músculo gastrocnemius direito sob ação da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e sua fração.

Nos animais controles não foram observados nenhuma alteração nos tecidos do músculo gastrocnemius (Fig. 11A e 12A). Nos animais tratados com a peçonha bruta e fração P5 encontrou-se alterações mais acentuadas quando injetadas a peçonha bruta e fração P5. Estas alterações foram semelhantes: solubilização do material intracelular eosinofílico, invasão leucocitária e resquícios de células musculares necrosadas por células fagocíticas (Fig. 11B, B e C; 12B, B e C).

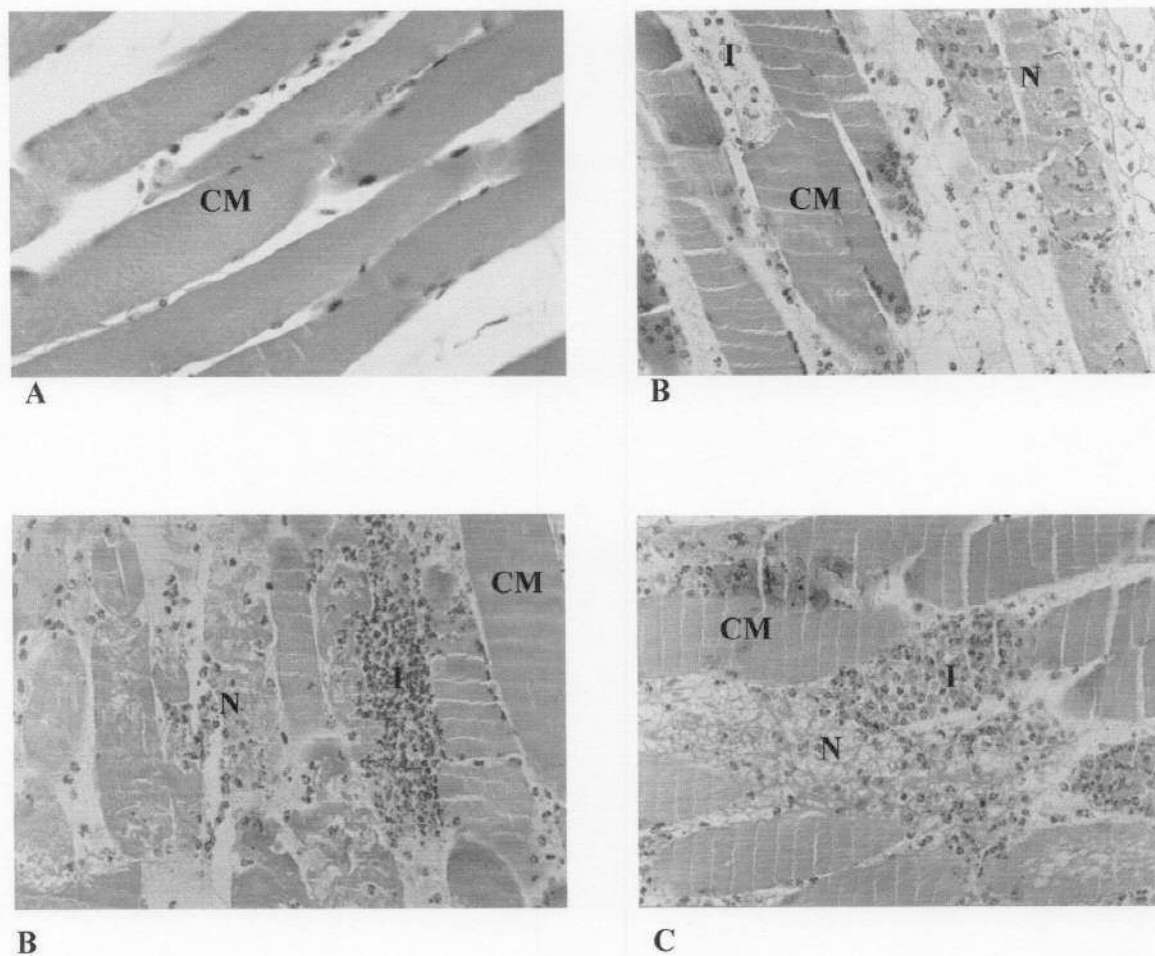


Figura 11: Fotomicrografia de Corte longitudinal, de 5 μ m de espessura do músculo gastrocnemius direito de camundongos após 24 horas de inoculação

Legenda:

A - Controle

B - Peçonha Bruta

C - Fração P5

CM - Células musculares estriadas esqueléticas

I - Infiltrado Leucocitário

N - Necrose

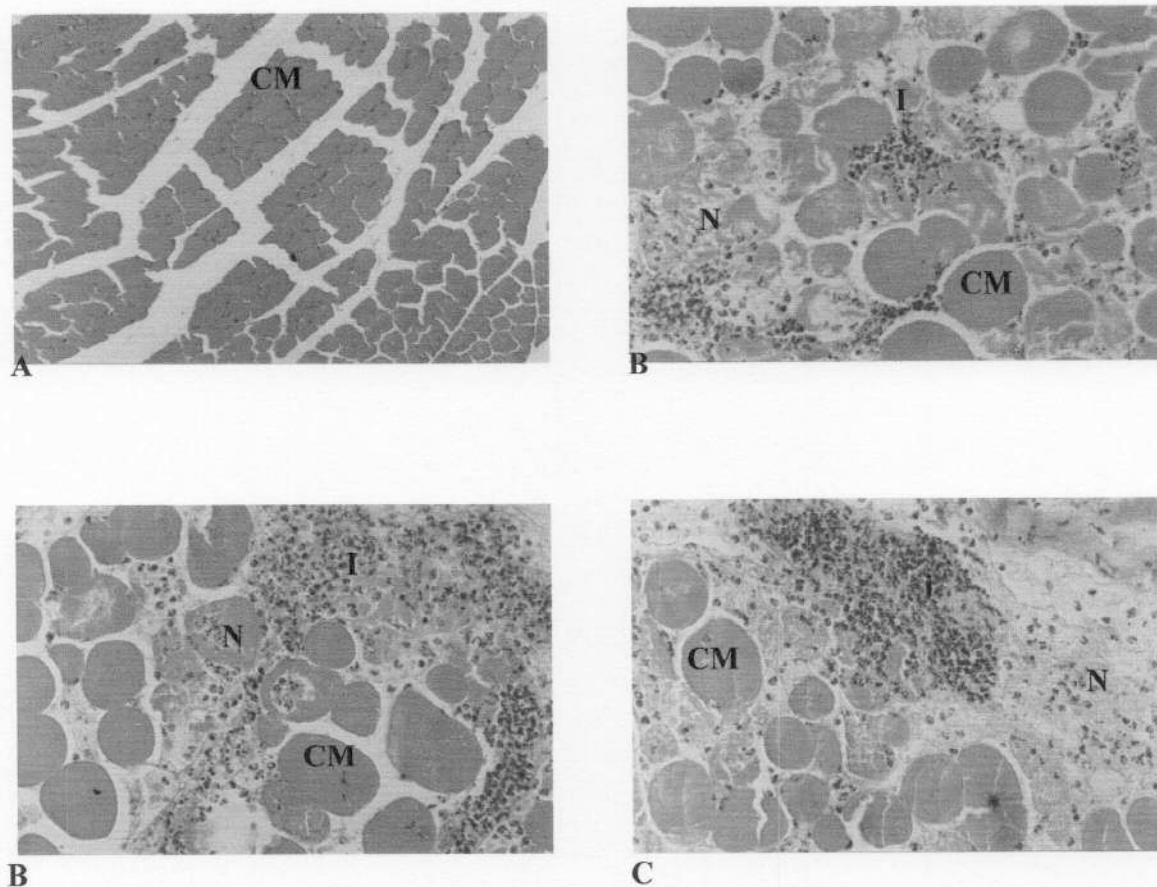


Figura 12: Fotomicrografia de Corte transversal, de 5 μ m de espessura do músculo gastrocnemius direito de camundongos após 24 horas de inoculação.

Legenda:

A - Controle

B - Peçonha Bruta

C - Fração P5

CM- Células musculares estriadas esqueléticas

I - Infiltrado Leucocitário

N - Necrose

6 – DISCUSSÃO

Dos animais peçonhentos que acometem a população humana as serpentes são os mais freqüentes, levando a quadros clínicos sérios podendo chegar ao óbito se não tratados (Chipaux *et al.*, 1991).

As serpentes do gênero *Bothrops* são bastante comuns na América do Sul (Chipaux *et al.*, 1991), apresentando maior freqüência nos acidentes ocorridos no Brasil, onde as vítimas são atingidas principalmente nos membros inferiores (Barraviera, 1994). O envenenamento provocado por estas serpentes pode causar hemorragia e necrose no local da picada, podendo ser necessária a amputação do membro afetado.

O objetivo deste trabalho foi fracionar a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e purificar a proteína miotóxica responsável pelas alterações morfológicas em músculo esquelético de camundongos. Para isso, foram realizados alguns fracionamentos a fim de encontrar as melhores condições tais como: tipo de resina, pH, dimensões da coluna, etc.

As miotoxinas de peçonhas botrópicas são proteínas básicas, de P.M. entre 13 a 15.000, apresentam de 6 a 8 pontes dissulfeto intracadeia, o que lhes dão uma estabilidade muito grande em relação ao pH e temperatura e podem ou não apresentar atividade PLA2. As PLA2 miotóxicas estão divididas em duas categorias: uma com atividade enzimática, as miotoxinas Asp 49, e outra que não apresenta atividade enzimática, as miotoxinas Lys 49, mas que podem ser classificadas como miotoxinas que possuem estrutura de fosfolipases.

Com base nesses dados, este trabalho teve início investigando-se a termoestabilidade das toxinas da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Foi feito o aquecimento das amostras com o intuito de precipitar e eliminar componentes que não eram de nosso interesse para este estudo, tais como hemorraginas e toxinas coagulantes. O aquecimento pode desnaturar e precipitar algumas proteínas e com este procedimento pode-se fazer uma prévia purificação a fim de separar as fosfolipases resistentes à temperatura.

Nas eletroforeses realizadas após o tratamento da peçonha em pHs 3,5 e 7,0 e temperatura a 100°C ou não se observou que não houve alteração no perfil eletroforético das amostras.

A atividade fosfolipásica em nossos experimentos foi analisada sempre em pH 8,0, embora a enzima inicialmente tenha sido tratada em pH diferente. Os resultados mostraram que as amostras tratadas em pH 7,0 apresentaram atividade PLA2 específica da peçonha mais elevada, mas em pH 3,5 a amostra manteve cerca de 90% desta atividade. Desta forma, foi possível observar que as fosfolipases são termoestáveis a 100°C e o pH ácido é melhor que o neutro para preservá-la.

Determinadas peçonhas de serpentes conservam algumas toxinas hemorrágicas ativas depois de serem expostas a altas temperaturas, indicando assim que estas são relativamente termoestáveis. A atividade hemorrágica obtida para a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* mostrou que, quando submetida ao aquecimento em pH 7,0 o halo hemorrágico era bem menor quando comparado ao halo da peçonha não aquecida, indicando assim que nesta algumas toxinas hemorrágicas são termoestáveis.

O aquecimento também interfere com a atividade coagulante da peçonha. Quando submetida ao aquecimento em pH 7,0 a peçonha manteve 30% da sua atividade, assim pode-se dizer que ocorreu desnaturação da maioria das toxinas coagulantes presentes na peçonha.

O primeiro fracionamento cromatográfico em SP-Sephadex C-25 da peçonha aquecida foi resolvido em somente quatro picos de absorbância a 280nm designadas de P1 a P4 e a atividade PLA2 foi encontrada apenas no pico P1. Quando se tentou realizar os outros

ensaios, foi observada que as amostras estavam inativas, provavelmente devido ao grande tempo em que foram armazenadas no freezer, sem serem liofilizadas, por motivos de reparos no liofilizador. Também, quando se calculou o rendimento protéico da peçonha bruta após aquecimento observou-se que dos 100 mg de amostras pesados, após aquecimento obteve-se somente 10 mg de proteínas dosadas para serem aplicados à coluna. Desta forma a peçonha foi submetida à nova cromatografia de troca catiônica, mas agora sem ser aquecida. De maneira geral a maioria das miotoxinas de peçonhas botrópicas são proteínas de natureza básica (Soares *et al.*, 1998), isoladas em géis trocadores catiônicos (Moura da Silva, *et al* 1991).

Assim a peçonha bruta foi fracionada em SP-Sephadex C-25, tampão acetato de amônio 0,05M pH 5,5, utilizando-se um gradiente contínuo de concentração molar de NaCl. Foram encontrados onze picos de absorbância a 280nm, designados N1 a N10, pode-se observar que a quantidade de picos encontrados teve aumento, podendo-se dizer que a cromatografia foi satisfatória, pois teve uma melhor separação de proteínas quando comparado ao fracionamento anterior.

As eletroforeses realizadas com frações obtidas nesta cromatografia serviram para acompanhar e avaliar o processo de purificação destes componentes protéicos.

Em géis de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes as frações N3 e N8 apresentaram banda única, já para as frações N1, N2 e N10 não foi possível detectar bandas, provavelmente devido à pequena quantidade de proteínas existentes nas mesmas.

A fração N3 apresentou alto peso molecular em torno de 66kDa e a fração N8 apresentou um componente de baixo peso molecular em torno de 15kDa. As demais frações apresentaram várias bandas protéicas.

A atividade fosfolipásica foi observada em cinco frações: N1, N4, N5, N6 e N6'.

O rendimento protéico deste fracionamento foi de 55% e a recuperação da atividade PLA2 foi de 41,3%, sendo que a fração N1 representou apenas 9,5% da peçonha bruta e apresentou atividade específica de 430U/mg/min sendo purificada quase três vezes.

Por outro lado, os ensaios “in vivo” desta mostraram que as atividades hemorrágicas foram encontradas nas frações N5 apresentando várias bandas em SDS-PAGE e fração N7 com duas bandas principais. Muitas toxinas hemorrágicas já foram isoladas das peçonhas das serpentes da família *Viperidae*. Estas toxinas são metaloproteinases dependentes de zinco ou de cálcio (Marsh, 1994) e podem causar hemorragia pela destruição enzimática da membrana basal, com subsequente perda da integridade vascular.

Já as toxinas coagulantes foram encontradas em duas frações distintas N4 e N5, mas apresentavam tempo de coagulação aproximadamente 5 vezes maior que o da peçonha bruta.

Para analisar a pureza das frações obtidas nesta cromatografia foram realizadas eletroforeses em condições não desnaturantes, mas devido a grande quantidade de sal existente nas amostras a resolução dos géis não foi satisfatória. O tampão usado nesta cromatografia não foi um tampão volátil, com isso no momento da liofilização o sal se concentra na amostra, impedindo assim uma boa resolução do perfil eletroforético.

O segundo método de purificação testado foi em gel de CM-Sephadex C-25, onde se obteve seis picos de absorbância a 280nm e a atividade fosfolipásica foi encontrada apenas no pico P1. Quando comparamos estes dois cromatogramas pudemos verificar que a peçonha bruta fracionada em CM-Sephadex C-25 apresentou um menor número de frações que em SP-Sephadex C-25. No entanto, as alterações introduzidas favoreceram a resolução das proteínas básicas desta peçonha (frações P5 e P6 em CM comparando com N9 e N10 em SP), ao mesmo tempo em que o tampão volátil foi introduzido nesta cromatografia. Sabendo ainda que as proteínas miotóxicas de peçonhas botrópicas são todas de caráter básico, como amplamente relatado na literatura, consideramos que esta última cromatografia apresentou melhores resultados na purificação da miotoxina de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

As eletroforeses realizadas após esta cromatografia serviram para acompanhar o processo de purificação dos componentes presentes na peçonha.

Em géis de poliacrilamida sem agentes desnaturantes, a fração P5, como pode ser visto na figura 10b apresentou-se pura. Quando a eletroforese foi realizada na presença de agentes desnaturantes, novamente a fração P5 apresentou-se como banda única e peso molecular de uma fosfolipase, podendo ser uma fosfolipase, uma miotoxina ou ambos. Como foi visto nos resultados, esta fração não possui atividade fosfolipásica, desta maneira testou-se a ação miotóxica desta fração, constatando-se assim que ela é uma miotoxina que não possui atividade fosfolipásica.

O estudo histológico evidenciou uma grande degeneração nas fibras musculares quando o músculo esquelético foi submetido à ação da peçonha bruta, ocorrendo também alterações do tecido conjuntivo que apresentou aspecto de ter sido digerido. As alterações morfológicas causadas pela fração P5 se assemelham quase que totalmente àquelas causadas pela peçonha bruta em relação às fibras musculares. Mas para a peçonha bruta observou-se uma grande quantidade de hemáceas e vasos lesados, enquanto a fração miotóxica apresentou um efeito degenerativo específico sobre as células musculares, não afetando vasos sanguíneos. A fração P5 é altamente lesiva para o tecido muscular, causando necrose celular e a presença de infiltrado leucocitário, mostrando assim uma reação inflamatória em resposta a miotoxina injetada.

7 – CONCLUSÃO

O fracionamento em CM-Sephadex C-25 foi bastante satisfatório, pois em uma única etapa conseguimos purificar a proteína miotóxica da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Esta miotoxina tem somente uma subunidade, é de caráter básico e apresentou baixo peso molecular, em torno de 15KDa. Quando testada sobre substrato artificial (gema de ovo) a toxina não apresentou atividade fosfolipase A2.

As alterações morfológicas observadas mostraram que a peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e a fração P5 exercem uma ação degenerativa sobre o tecido muscular estriado esquelético do músculo gastrocnemius de camundongos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C.; *et al.* Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, 23: p. 691-706, 1985.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: Uma visão integrada**. 1. ed. Rio de Janeiro. Editora de Publicações Científicas Ltda., 1994. 411 p. IBSN 94-0062
- BIEBER, A. L. Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: Snake Venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology**. LEE, C. Y. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979, v. 52, 295 p.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M. & OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, 31: p. 1137-50, 1993.
- CAMPBELL, J. A., LAMAR, W. W. The venomous reptelis of Latin America. **Ithaca: Cornell University Press**. 425, 1989.

- CHIPPAUX, J. -P.; WILLIAMS, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29: p. 1279- 303, 1991.
- DAVIS, B. J. Disk eletrophoresis II, method and application to human serum proteins. **Ann. NY. Acad. Sci.** v. 121, p. 404-427, 1964.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; *et al.* Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochim. Biophys. Acta**, 24: p. 103-17, 1968.
- DENSON, K. W. E. Coagulant and anticoagulant action of snakes venoms. **Toxicon**, v.7, p 5-11, 1969.
- DENSON, K.W.E.; BORETT, R. & BIGGS, R. The specific assay of prothrombin using the Taipan snake venoms. **Brit. J. Haematol.** V. 21: p. 219-226, 1971.
- EAGLE, H. The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance. **J. Exp. Med.** v. 65: p. 613-639, 1937.
- FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L. & MOTA. Toxic activities of venom from *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**. v. 30 (12), p. 1608-1614, 1992.
- FINN, C. A. & McLAREN, A. A study of the early stage of implantation in mice. **J. Reprod. Fertil.** v. 13, p. 259-267. 1967..
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33: p. 1405-24, 1995.
- HARRIS, J. B. Phospholipase in snake venoms and their effects on nerves and muscle. **Pharmac. Ther.** V. 31, p. 79-102, 1985.

- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; *et al.* Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26: p. 615-27, 1988.
- ITZHAKI, R. F. & GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v 9: p.401-10, 1964.
- IWANAGA, S & SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In. Snake venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Lee, C. Y. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg- New York, v. 52, cap 4, p. 105. 1979.
- KINI, R. & EVANS, H. J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. **Int. J. Peptide Prot. Res.** v. 34, p. 277-286. 1989.
- KLEMMER, K. Liste der rezenten Giftschlangen. Elapidae, Hydrophidae, Viperidae and Crotalidae. In: Die Giftschlangen der Erde. Wirkung und Antigenität der Gifte. Therapie von Giftschlangenbissen. Behringwerk-Mitteilungen. Marburg/Lahn: Elwert., p. 255. 1963.
- KORNALICK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: **Handbook of Toxinology**. New York: Marcel Dekker, p. 683.1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: p. 680-9, 1970.
- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A. *et al.* Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: Isolation and characterization of piratoxin-1. A new myotoxic protein. **Toxicon**. v. 33, p. 615-626, 1995.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**. v.22, p.193-196, 1984.

MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Hemorrhagic factors from the venom of two species of *Bothrops* snakes. **Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre toxinas proteicas**. 1988.

MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**. v.20, p. 955-972, 1982.

MARAGANORE, J. M.; HEINRIKSON, R. L. The Lysine-49 phospholipase A2 from venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipase A2. **J. Bio. Chem.** v. 26, p. 4797-4804. 1986.

MEBS, D. & OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.** V. 48, p. 223-236, 1990.

MOURA-da-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; *et al.* Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 29: p. 713-23, 1991.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M. *et al.* Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.** V. 231, p. 309-311, 1984.

NISHIOKA, S. A. & SILVEIRA, P. V. P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hug.**, 47: p. 805-10, 1992.

- PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical Squamata. Part 1. Snakes. V. S. **Natl. Mus. Bul.** v. 297, p. 1-347, 1970.
- REISFELD, R. A.; LEWIS, V. L. & WILLIAMS, D. E. Disk eletrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, 195: p. 281-3, 1962.
- RIBEIRO, L. A.; PIRES DE CAMPO, V. A. F.; ALBUQUERQUE, M. J. et al. Acidente ofídico no estado de São Paulo. **Revista Ass. Med. Brasil.** v. 39 (1), p. 7-10, 1993.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous animals and their venoms** (Burchel, W., Buckeley, E.; Deulofeu, V.; 9ª edição). Academic Press, New York. vol. II, p. 345-384, 1971.
- SEEGERS, W. H. & OUYANG, C. Snake venoms and blood coagulation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer-Verlag Berlin. v. 52, cap. 18, 684p, 1979.
- SOARES, A. M. **Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: seqüência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição dos estados nativo e desenovelado.** 1997, 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.
- SOARES, A. M.; ANZALONI PEDROSA, L. H.; FONTES, M. R. M.; et al. Polyacrilamide gel electrophoresis as a tool the taxonomic identification of snakes from the Elapidae and Viperidae families. **J. Venom. Anim, Toxins**, 4: p. 137-42, 1998.
- STOCKER, K. F. & BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). In: **Methods in Enzymology**, (Lorand, L., Ed.). New York: Academic Press, v. 45, p. 214, 1976.

RODRIGUES, V. M. **Purificação e caracterização química parciais de duas miotoxinas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada).** 1996, 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.

WEISS, H. J.; ALLAN, S.; DAVIDSON, E.; *et al.* **Am. J. Med.** v. 47, p. 625, 1969.